

LA BIOLUMINISCENCIA DE MICROORGANISMOS MARINOS Y SU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.

Claudia Isabel Sáenz Marta y Guadalupe Virginia Nevárez Moorillón

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Circuito Universitario No. 1, Nuevo Campus Universitario. Chihuahua, Chih. 31125. Correo electrónico: vnevare@uach.mx

RESUMEN

El fenómeno de bioluminiscencia se refiere a la luz producida por organismos vivos, y de entre ellos, los más abundantes son bacterias de origen marino. Las bacterias luminiscentes marinas más estudiadas son las especies de *Vibrio harveyi* y *Vibrio fischeri*, que se encuentran asociadas a otros organismos marinos (peces, calamares, etc) o de forma libre. El mecanismo de luminiscencia por parte de estos microorganismos, esta dado por una reacción bioquímica en la que participan la luciferina, el oxígeno, la enzima luciferasa y el ATP, para dar como resultado la formación de luz y agua. Este proceso está regulado por varios genes denominados lux. A su vez la expresión de estos genes está regulada por el fenómeno de *quorum sensing*, que se refiere a la comunicación entre bacterias, dado que la emisión de luz solo aparece cuando existe una alta densidad celular. El mecanismo de producción de luz por bacterias marinas luminiscentes, permite su aplicación posterior en diferentes sistemas biológicos, aprovechando el mecanismo bioquímico de producción de luz, como un indicador de actividades específicas. El uso del sistema luciferina/luciferasa como marcadores bioquímicos, han permitido el desarrollo de sistemas de monitoreo en aplicaciones ambientales, sanitarias, clínicas y genéticas. El sistema ha servido tanto de modelo para el estudio de los procesos de intercomunicación entre los organismos, como herramienta para el desarrollo de sistemas de monitoreo biológico, basados en la producción de luz y la cuantificación indirecta del ATP

Palabras clave: Bioluminiscencia, Genes lux, Ambiente marino, *quorum sensing*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*

INTRODUCCIÓN

La bioluminiscencia es un interesante proceso bioquímico, por el que los organismos emiten luz. Este fenómeno ocurre en muchas especies de animales tanto vertebrados como invertebrados, plantas, hongos, insectos y bacterias. (Wegrzyn y Czyz, 2002). Estos organismos están ampliamente distribuidos a lo largo del planeta en numerosos ambientes, pero de todos los organismos, se consideran a las bacterias bioluminiscentes como las más abundantes en la naturaleza (Meighen, 1993). El hábitat principal de estas especies es el océano, ya sea que se encuentren viviendo de manera libre o asociadas frecuentemente de manera simbiótica (en el tracto intestinal y en órganos luminosos) con otros organismos marinos (González y Díex, 1996).

Las especies de bacterias marinas mayormente estudiadas son *Vibrio harveyi* y *Vibrio fischeri*. Se sabe que *V. harveyi* puede estar asociado al intestino de algunos animales marinos o encontrarse como un microorganismo de vida libre en el océano; mientras que *V. fischeri* además de encontrarse en estos hábitats también vive en cultivo puro como simbionte de los órganos productores de luz en varios peces y calamares (Bassler y col., 1997). *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium leiognathi* y *Xenorhabdus luminescens*, son ejemplos de otros microorganismos bioluminiscentes que ha proporcionado información valiosa (Winpee y col., 1991; Meighen, 1993). Estos organismos han captado la atención de investigadores a lo largo de la historia, desde Caius Plinius (23-79 A.D) hasta Harvey en 1957 (Koncz y col., 1990), dada su notable belleza en la oscuridad debida a su capacidad de emitir luz. Sin embargo, los orígenes de estas bacterias aun no están claramente establecidos. Una de estas razones es que la mayoría de los organismos bioluminiscentes son relativamente inaccesibles a la investigación, por la distribución ecológica de los mismos. Desde su descubrimiento, se han propuestos diversas teorías para entender el mecanismo de emisión de luz. (Rees y col., 1998).

La facilidad de evaluar una respuesta fisiológica a partir de la producción de luz, han convertido al estudio de la bioluminiscencia en un sistema modelo de regulación biológica. Ha sido de vital importancia para la descripción de los mecanismos de comunicación celular entre los organismos, mecanismo conocido como *quorum sensing*, y que está relacionado con la regulación del crecimiento microbiano en función de la cantidad de microorganismos presentes. La descripción del mecanismo biológico y regulación genética, son temas que siguen entre los temas de avanzada en fisiología microbiana. Por otra parte, el conocimiento de los genes involucrados y su incorporación en otros microorganismos por medio de técnicas de DNA recombinante, abren la posibilidad de desarrollar sistemas de monitoreo para ser aplicados en áreas tan diversas como la industria farmacéutica, alimentaria o ambiental. En la presente revisión, nos enfocaremos a explicar el fenómeno de bioluminiscencia en las bacterias marinas, así como su utilización dentro de la biotecnología moderna.

EL FENÓMENO DE EMISIÓN DE LUZ

La capacidad de emitir luz en bacterias bioluminiscentes marinas, así como su función en términos de sobrevivencia, fisiología y metabolismo ha sido tema de frecuente discusión. Se sabe que las bacterias que se encuentran en simbiosis con organismos marinos, les proporcionan ventajas en el ecosistema, ya sea porque utilicen la luz como un sistema de comunicación entre especies, como mecanismo de defensa o para la atracción de presas. (Meighen, 1993; Showalter y col., 1990). Sin embargo, aun no se entiende por completo qué beneficio obtienen las bacterias simbiotes al producir luz. Por otra parte, parece obvio que la luminiscencia debe tener un valor importante, dado la cantidad de energía celular que es consumida en este proceso (Czy y col., 2000).

La reacción de emisión de luz por parte de estas bacterias depende de la enzima luciferasa. Esta es una enzima dimerica que consiste en dos subunidades (α y β), y tiene un peso molecular aproximado de 80KDa (Wood, 1998). La actividad catalítica de esta enzima requiere de tres substratos: luciferina, oxígeno y ATP. El producto de la catálisis es un estado oxidado de la luciferina a un componente de dioxetano, que es inestable. Este emite un fotón y produce CO_2 y oxiluciferina. (Berovic y col., 2009). Considerando la estequiometría de la reacción, por cada molécula de ATP consumida se emite aproximadamente un fotón. Esta propiedad, junto con la alta especificidad de la enzima por el nucleótido, hace que esta reacción sea un sistema analítico ideal para detectar la presencia de ATP, su producción o consumo, que depende de la actividad enzimática y para cuantificar substratos relacionados con el metabolismo del ATP (García y col., 2001).

Los primeros estudios sobre el mecanismo de bioluminiscencia bacteriano sugerían una serie de pasos metabólicos. Inicialmente, se propuso que una molécula reducida de mononucleótido de flavina (FMNH_2) se utilizaba para reducir la luciferasa. Estas conclusiones se modificaron rápidamente, al encontrarse que dos moléculas de flavina en lugar de una, eran las que estaban involucradas en esta reacción. Otras investigaciones sugieren que una molécula de FMNH_2 combinada con el oxígeno forma un peróxido altamente reactivo, mientras que otro se combina con una molécula de aldehído para formar un componente de FMNH_2 -aldehído. (Nunes y Durán, 2003). En la actualidad se sabe que la reacción conduce a la oxidación de FMNH_2 a FMN, así como a la oxidación de aldehídos a ácidos grasos.



Los ácidos grasos producidos en la reacción catalizada por la luciferasa son subsecuentemente reducidos a aldehídos por una reductasa específica, resultando en una emisión luz azul-verde a una longitud de onda de 490 nm. (Wegrzyn y Czyz, 2002). La inducción del sistema de bioluminiscencia durante el crecimiento en algunas bacterias marinas, se acompaña de la síntesis de polipéptidos, que se sugiere están involucrados en la síntesis enzimática del aldehído (Riendeau y Meighen, 1979). Así pues se sabe que en la misma reacción, el $\text{NADPH} + \text{H}^+$ se convierte a NADP^+ y el ATP es hidrolizado a ADP. Como se puede observar, la bioluminiscencia es un proceso en el que se consume energía; de hecho, para producir luz, las bacterias podrían usar un 20% de la energía total de la célula (Wegrzyn y Czyz, 2002).

REGULACIÓN GENÉTICA

La regulación genética del proceso de bioluminiscencia en bacterias, está controlado en el operon *luxCDABE* (Figura 1), en donde se encuentra cinco genes estructurales requeridos para la emisión de luz: los genes *luxC*, *luxD* y *luxE* que codifican para el complejo reductasa de los ácidos grasos necesarios para reciclar el substrato aldehído, y *luxA* y *luxB* que codifican para las subunidades α y β de la luciferasa. (Frackam y col., 1990; Wood, 1998; Xi y col., 1991). También se ha observado la expresión de otros genes como el *luxG* y el *luxH*, que podrían codificar para algunas proteínas involucradas en la biosíntesis de la flavina (Freeman y Bassler, 1999).

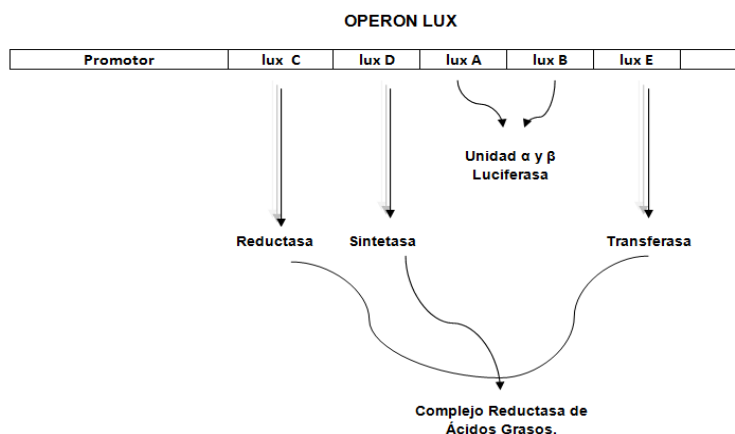


Figura 1. Operon lux de bacterias marinas luminiscentes.

Existen pocas diferencias entre los diferentes sistemas lux de las bacterias marinas. Por ejemplo, ante del gen luxC, existen dos genes regulatorios el luxI y el luxR en el caso de *V. fischeri*; mientras que en *V. harveyi* y especies de *Photobacterium*, existe una región rica en A-T de más de 500pb sin extenderse a los marcos de lectura abiertos. Después del gen luxG en *V. fischeri* se encuentra el sitio de terminación del operon, mientras que en *V. harveyi* el operon lux contiene otro gen, el luxH antes del sitio de terminación (Meighen y Sztittner, 1992). También se ha encontrado en *P. phosphoreum* un gen extra, el luxF, que se encuentra localizado entre luxB y luxE. El gen luxF presenta homología con los genes luxA y luxB y codifica para una flavoproteína de función desconocida (Swartzman y col., 1990).

La expresión del operon lux es regulado tanto a nivel transcripcional como traduccional. El gen luxR codifica para una proteína regulatoria mientras que luxI es responsable de la síntesis de un autoinductor. Primero se produce la proteína luxR, y por consecuencia, el operon luxCDABE es expresado en muy bajos niveles. A mayor densidad celular, un aumento en la concentración de la proteína luxR, obligado por el autoinductor, conduce a la activación del operon luxICDABE, que conlleva a la producción de luz. Después, la concentración de la proteína luxR se vuelve limitante porque el complejo proteína-autoinductor de luxR inhibe la traducción del transcrito luxR (Koncz y col., 1990, Manefield y col., 1999).

Cuadro 1. Diversidad de genes lux en bacterias marinas luminiscentes.

GEN	MICROORGANISMO	FUNCIÓN
lux A	<i>Vibrio harveyi</i> <i>Vibrio fischeri</i> <i>Photobacterium phosphoreum</i>	Subunidades de α de la luciferasa
lux B		Subunidades de β de la luciferasa
lux C		Complejo Reductasa de ácidos grasos
lux D		
lux E		
lux F	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Flavoproteína
lux G	<i>Vibrio harveyi</i>	Biosíntesis del sustrato flavina
lux H	<i>Vibrio harveyi</i>	
lux I	<i>Vibrio fischeri</i>	Síntesis del autoinductor
lux R	<i>Vibrio fischeri</i>	Proteína Regulatoria

Los operones lux también son regulados por represión catabólica, porque sus promotores contienen sitios de unión a cAMP (adenosin monofosfato cíclico) (Koncz y col., 1990). Las enzimas inducibles presentan funcionalidad solo bajo ciertas condiciones; para muchos autores, la inducción de estas enzimas está mediada por nutrientes específicos, para los que no se producen constantemente las enzimas. Por otra parte, se ha mostrado que la

inducción en la síntesis de algunas enzimas, es frecuentemente reprimida por la glucosa, incluso en presencia del inductor, y esta represión puede ser superada por cAMP exógeno; la represión de la glucosa y la inversión por cAMP es a lo que se le llama represión catabólica (Nealson y Hastings, 1979). El tipo de regulación a través de un inductor es un tema de intensa investigación debido a la interesante información que proporciona sobre la comunicación entre las bacterias (Phieffer y col., 1999).

Quorum sensing

Está bien establecido que las bacterias bioluminiscentes emiten luz sólo cuando existe alta densidad celular; una sola célula bacteriana de vida libre en el océano no se espera que emita luz. El entendimiento del mecanismo de esta regulación provee los principios básicos de la emisión de luz por parte de las bacterias marinas y a su vez, auxilia en el entendimiento de los mecanismos de comunicación celular, mejor conocida como *quorum sensing* (Czy y col., 2002). El fenómeno de *quorum sensing* fue descrito por primera vez en 1970 por Nealson y Hastings, en la Universidad de Harvard, cuando observaron que *Photobacterium fischeri* (actualmente conocido como *Vibrio fischeri*) no presentaba bioluminiscencia hasta que se alcanzaba una determinada densidad celular. Basados en esta observación, se propuso como hipótesis que la bioluminiscencia en estos microorganismos, estaba regulada por moléculas mensajeras que viajaban entre las células. Se llamó a estos mensajeros, "autoinductores" (Gonzalez y Keshavan, 2006).

No debe confundirse autoinducción con autoregulación o autorepresión, dos términos similares que describen fenómenos totalmente diferentes. La autoinducción define un sistema ambiental, que permite a las bacterias controlar su propia densidad de población. El autoinductor producido por las bacterias, se acumula en el medio circundante durante la fase de crecimiento y cuando la población alcanza altos niveles de densidad, esta sustancia se acumula hasta alcanzar una concentración crítica, produciendo la activación específica de genes, por ejemplo, los relacionados con luminiscencia (Fuqua y col., 1994). El fenómeno de autoinducción puede incrementar hasta 10,000 veces la emisión de luz por cada célula (Engelbrecht y Silverman, 1984).

Este tipo de regulación resulta en una luminiscencia visible cuando las células se encuentran en colonias o en las superficies de materia orgánica en descomposición o como simbiontes en los órganos específicos de emisión de luz dentro de organismos marinos como los peces y los cefalópodos. En cambio, los estudios demuestran que en el mar y otros ambientes donde las concentraciones de *V. fischeri* son rara vez más de unas pocas células por mililitro, el autoinductor no se acumula a un nivel suficiente para que la luminiscencia pueda ser visible (Boettcher y Ruby, 1990). En las bacterias Gram-negativas, el mecanismo de *quorum sensing* se activa mediante la producción y respuesta de un autoinductor específico, la acil-homoserina-lactona (acil-HSL), y el ejemplo más estudiado es el mecanismo en *V. fischeri*. (Shauder y col., 2001). Una característica interesante de este tipo de sistema es que el gen que sintetiza el autoinductor es el blanco de luxR. Así, se presenta una activación en cascada en el *quorum sensing*, que resulta en un incremento en la expresión de la síntesis del autoinductor, llevando a la producción de más acil-HSL, de tal manera que actúa como una retroalimentación positiva y amplifica significativamente el efecto de *quorum sensing* (Stevens y Greenberg, 1997; Gonzalez y Keshavan, 2006).

También se ha estudiado la influencia de análogos del autoinductor en la inducción de luminiscencia en *V. fischeri*. Algunos análogos son capaces de inducir luminiscencia, uniéndose a luxR de manera que activan la expresión de los genes de luminiscencia o inhiben la activación natural de la acil-HSL; otros análogos muestran poco o ningún efecto sobre la inducción de la luminiscencia. Esto último sugiere su influencia en la comunicación celular, lo que fue reconocido cuando se comenzó a utilizar el término alloinducción, para describir la inducción de los genes de luminiscencia en *V. fischeri* por señales extracelulares (alloinductores) de otras bacterias marinas que coexistían junto con esta especie. Bajo algunas condiciones, el inductor de *Pseudomonas aeruginosa* es un fuerte inhibidor de la autoinducción de los genes de *V. fischeri*, sugiriendo que es posible que una especie con una alta densidad celular, pueda producir una señal que interfiera con la capacidad de otras especies para colonizar con éxito un hábitat en particular (Schaefer y col., 1996).

APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Considerando lo interesante del fenómeno de bioluminiscencia, es fácil entender porqué se ha estudiado a tal profundidad, y los beneficios que se han derivado de ese conocimiento. Conocer el mecanismo exacto por el que estas bacterias producen luz, ha permitido describir fenómenos de comunicación entre bacterias, así como identificar las condiciones que conducen a estos microorganismos a emitir luz. Además, la regulación de la expresión de genes en el sistema de bioluminiscencia, permite una evaluación fenotípica rápida, por la medición de energía luminosa emitida. Esto ha permitido el uso de este sistema bioquímico, en muchas aplicaciones biotecnológicas.

Uno de los más importantes y serios problemas de contaminación ambiental, es la dispersión de agentes que pueden inducir enfermedades graves, incluyendo el cáncer. La detección de compuestos mutagénicos en

muestras tomadas de hábitats naturales ha tomado especial interés, y por consecuencia, las pruebas de mutagenicidad microbiológica son herramientas útiles para su detección (Wegrzyn y Czyz, 2003). El uso de bacterias bioluminiscentes en la detección de compuestos químicos tóxicos se ha propuesto desde hace más de 20 años, y se han descrito ya varios ensayos que se encuentran disponibles comercialmente. La base del ensayo es la medición de la toxicidad de un compuesto determinado, por un método relativamente simple, basado en la medición del decremento en la producción de bioluminiscencia al agregar componentes tóxicos a cultivos microbianos (Wegrzyn y Czyz, 2002). El cambio en la intensidad de la luminiscencia es proporcional al efecto total de los contaminantes presentes en el medio. Además de obtener una respuesta rápida y con una alta sensibilidad, una ventaja de los biosensores luminiscentes es la buena correlación entre los resultados obtenidos con su uso y los resultados obtenidos con bioensayos en modelos animales más complicados (Deryabin y Aleshina, 2008).

Los bioensayos para la evaluación de la genotoxicidad se basan en la respuesta al daño del DNA inducido por la genotoxina en las células bacterianas. Los resultados con frecuencia se utilizan para inferir a partir de ellos, los efectos mutagénicos y cancerígenos que pueden presentarse en los humanos y la biota. Recientemente, se han empezado a utilizar biosensores de bacterias genéticamente modificadas (luminiscentes) para detectar una variedad de contaminantes ambientales. Estas bacterias recombinantes llevan el operon *lux* originario de *V. fischeri* o de otras bacterias marinas o solo el gen *luxAB* que codifica para la luciferasa, y están bajo control de un promotor especial inducible en la detección de mercurio, arsénico y cadmio, o naftaleno y salicilato. Estos biosensores generan una inducción rápida de bioluminiscencia, con un lapso de respuesta de 1 hora, en presencia de contaminantes ambientales (Ptitsyn y col., 1997).

A través de estudios en *V. fischeri*, se sabe que algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) como la fenantroquinona en concentraciones relativamente bajas, son capaces de inhibir ciertas condiciones la capacidad de emitir luz, por competencia por electrones con las oxiluciferinas, bloqueando así la formación de las luciferinas. (Wang y col., 2009). En la actualidad, se han reportado el uso de cepas recombinantes de *Escherichia coli* productoras de bioluminiscencia, para monitorear la toxicidad celular de los HAPs, ya que estas cepas muestran pocos niveles de bioluminiscencia cuando el metabolismo celular se inhibe. Este estudio ofrece un nuevo método para la predicción de toxicidad celular de algunos HAPs a través de la utilización de bacterias recombinantes, las cuales albergan un gen *luxCDABE* fusionado al plásmido (Lee y col., 2003).

Las proteínas bioluminiscentes son herramientas bioquímicas invaluableles con aplicaciones en una amplia variedad de campos incluyendo los análisis de expresión de genes, descubrimiento de medicamentos, estudio de la dinámica de las proteínas y mapeo de las vías de traducción de señales. Las proteínas mayormente reportadas son luciferasas, que permiten una detección de alta sensibilidad y poseen características peculiares como un alto rendimiento cuántico y ausencia de toxicidad cuando se expresadas en células o en organismos diferenciados. Se han llevado a cabo extensos estudios para alterar las propiedades de las proteínas fluorescentes, dejando como resultado proteínas mutantes con diferentes ondas de excitación/emisión. Las proteínas bioluminiscentes son una alternativa al uso de proteínas fluorescentes debido a su alta sensibilidad en los análisis de detección en muestras biológicas (Dikici y col., 2009; Michelini y col., 2009).

Las investigaciones en las que se utiliza principalmente la expresión de los genes encargados de la producción de luz, provenientes de bacterias bioluminiscentes, en cepas recombinantes de bacterias no bioluminiscentes como *E. coli* y *P. aeruginosa*, están encaminadas hacia el estudio de la reparación del DNA debido a la exposición a luz UV. Por ejemplo, Czyz y colaboradores (2000) demostraron que la luminiscencia en *V. harveyi* puede estimularse por la radiación de luz UV incluso en cultivos diluidos, bajo condiciones en las que la emisión de luz por esta bacteria normalmente es mermada por regulación de *quorum sensing*. Se propuso que las bacterias luminiscentes podrían tener una fuente de luz interna que se utilice en los procesos de reparación del DNA por fotoreactivación. Otro estudio relacionado con la reparación del DNA fue el reportado por Elasri y Miller (1999), que utilizaron biosensores bioluminiscentes construidos con cepas recombinantes de *P. aeruginosa* productoras de biopelículas, para evaluar el daño al DNA producido por la luz UV. Los autores encontraron que la biopelícula ofrecía protección en contra de la luz UV. Este estudio también demostró que esta herramienta puede ser útil para las investigaciones sobre las comunidades microbianas de forma no invasiva.

CONCLUSIÓN

Existen muchos organismos que son capaces de producir luminiscencia, que están distribuidos en ambientes naturales; sin embargo, las bacterias marinas son las más estudiadas, debido a su abundancia y a ser fácilmente cultivadas en laboratorio. Desde su descubrimiento, estas bacterias han sido objeto de múltiples investigaciones, que han llevado al entendimiento de mecanismos bacterianos de regulación de la expresión genética. Uno de ellos es la reparación del DNA, pues al parecer las bacterias luminiscentes emiten luz en respuesta a daños producidos por la luz UV. Otro, es el descubrimiento de la comunicación entre las especies bacterianas, fenómeno denominado *quorum sensing*, fenómeno que ha permitido el estudio del proceso de luminiscencia bacteriana, pero que se ha

estudiado también en relación al comportamiento de las bacterias patógenas dentro de los seres vivos. Además, las bacterias luminiscentes se están utilizando en la detección de contaminantes ambientales y marinos. Estos descubrimientos muestran la importancia del estudio de las bacterias luminiscentes marinas y su amplio futuro dentro de la biotecnología.

BIBLIOGRAFÍA

- Bassler BL, Greenberg EP y Steven AM. 1997. Cross-Species Induction of Luminescence in the Quorum- Sensing Bacterium *Vibrio harveyi*. J. Bacteriol. **179**:4043–4045.
- Berovic N, Parker DJ y Smith MD. 2009. An investigation of the reaction kinetics of luciferase and the effect of ionizing radiation on the reaction rate. Eur Biophys J. **38**:427–435.
- Boettcher KJ y Ruby EG. 1990. Depressed Light Emission by Symbiotic *Vibrio fischeri* of the Sepiolid Squid *Euprymna scolopes*. J. Bacteriol. **172**:3701-3706
- Czy A, Plata K y Węgrzyn G. 2002. Induction of light emission by luminescent bacteria treated with UV light and chemical mutagens. J. Appl. Genet. **43**: 377-389.
- Czy A, Wróbel B y Węgrzyn G. 2000. *Vibrio harveyi* bioluminescence plays a role in stimulation of DNA repair. Microbiol. **146**:283-288.
- Deryabin DG y Aleshina ES. 2008. Effect of Salts on Luminescence of Natural and Recombinant Luminescent Bacterial Biosensors. Appl. Biochem. Microbiol. **44**:292–296.
- Dikici E, Qu X, Rowe L, Millner L, Logue C, Deo SK, Ensor M y Daunert S. 2009. Aequorin variants with improved bioluminescence properties. Protein Eng., Design & Selection. **22**:243–248.
- Elasri MO y Miller RV. 1999. Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation. Appl. Environm. Microbiol. **65**:2025–2031
- Engbrecht J y Silverman M. 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence (lux genes/recombinant DNA/complementation/minicells). Proc. Nat. Acad. Sci. **81**:4154-4158.
- Frackman S, Anhalt M y Nealon KH. 1990. Cloning, Organization, and Expression of the Bioluminescence Genes of *Xenorhabdus luminescens*. J. Bacteriol. **172**: 5767-5773.
- Freeman JA y Bassler BL. 1999. A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. Molecular Microbiol. **31**:665–677.
- Fuqua WC, Winans SC y Greenberg EP. 1994. Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. J. Bacteriol. **176**: 269-275
- García AM, Baeyens WRG, Zhang X, Alés F y Gámiz L. 2001. Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo. Ars Pharmaceutica. **42**:81-107.
- González, LZ y Diex PA. 1996. Bacterias bioluminiscentes marinas en la costa de Gran Canaria. Bol.Inst.Esp.Oceanogr. **12**: 139-144.
- Gonzalez JE y Keshavan ND. 2006. Messing with Bacterial *Quorum Sensing*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **70**:859–875.
- Koncz C, Landgridge WHR, Olsson O, Schell J y Szalay A. 1990. Bacterial and firefly luciferase genes in transgenic plants: advantages and disadvantages of a reporter gene. Develop. Genetics. **11**:224-232.
- Lee HJ, Villaume J, Cullen DC, Kim BC y Gu MB. 2003. Monitoring and classification of PAH toxicity using an immobilized bioluminescent bacteria. Biosensors and bioelectronics. **18**:571-577.
- Manefield M, De Nys R, Kumar N, Read R, Givsko M, Steinberg P y Kjelleberg S. 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. Microbiol. **145**:283-29.
- Meighen EA. 1993. Bacterial bioluminescence: organization, regulation y application of the *lux* genes. FASEB J. **7**:1016-1022.
- Meighen EA y Sztittner RB. 1992. Multiple Repetitive Elements and Organization of the lux Operons of Luminescent Terrestrial Bacteria. J. Bacteriol. **174**: 5371-5381.
- Michellini E, Cevenini L, Mezzanotte L, Roda B, Dolci LS y Roda A. 2009. Bioluminescent reporter proteins for multicolor assays. Minerva Biotecnol. **21**:87-96.
- Nealon KH y Hastings JW. 1979. Bacterial Bioluminescence: Its Control and Ecological Significance. Microbiol. Rev. **43**:496-518.
- Nunes HV y Durán NL. 2003. Bioluminescent bacteria: *lux* genes as environmental biosensors. Braz. J. Microbiol. **34**:91-96.
- Ptitsyn LR, Horneck G, Komova O, Kozubek S, Krasavin EA, Bonev M y Rettber P. 1997. A Biosensor for Environmental Genotoxin Screening Based on an SOS *lux* Assay in Recombinant *Escherichia coli* Cells. Appl. Environm. Microbiol. **63**:4377–4384.

- Phiefer CB, Palmer RJ y White DC. 1999. Comparison of relative photon flux from single cells of the bioluminescent marine bacteria *Vibrio fischeri* and *Vibrio harveyi* using photon-counting microscopy. *Luminescence*. **14**:147–151.
- Rees JF, Wergifosse B, Noise O, Dubuisson M, Janssens B y Thompson EM. 1998. The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defense mechanisms into deep-sea communication tools. *J. Experimental Biol.* **201**: 1211–1221.
- Riendeau D y Meighen E. 1979. Evidence for a Fatty Acid Reductase Catalyzing the Synthesis of Aldehydes for the Bacterial Bioluminescent Reaction. *J. Biol. Chem.* **254**: 7488-7490.
- Schaefer AL, Hanzelka BL, Eberhard A y Greenberg EP. 1996. Quorum Sensing in *Vibrio fischeri*: Probing Autoinducer-LuxR Interactions with Autoinducer Analogs. *J. Bacteriol.* **178**:2897–2901.
- Schauder S, Shokat K, Surette MG y Bassler BL. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molec. Microbiol.* **41**: 463–476.
- Showalter RE, Martin MO y Silverman MR. 1990. Cloning and Nucleotide Sequence of luxR, a Regulatory Gene Controlling Bioluminescence in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* **172**: 2946-2954.
- Stevens AM y Greenberg EP. 1997. Quorum Sensing in *Vibrio fischeri*: Essential Elements for Activation of the Luminescence Genes. *J. Bacteriol.* **179**:557–562
- Swartzman E, Kapoor S, Graham AF y Meighen EA. 1990. A New *Vibrio fischeri* lux Gene Precedes a Bidirectional Termination Site for the lux Operon. *J. Bacteriol.* **172**:6797-6802.
- Wang W, Nykamp J, Huang XD, Gerhardt K, Dixon DG y Greenberg BM. 2009. Examination of the mechanism of phenanthrenequinone toxicity to *Vibrio fischeri*: Evidence for a reactive oxygen species-mediated toxicity mechanism. *Environm. Toxicol. Chem.* **28**:1655-1662.
- Wegrzyn G y Czyz A. 2002. How do marine bacteria produce light, why are they luminescent, and can we employ bacterial bioluminescence in aquatic biotechnology? *Oceanologia*. **44**: 291–305.
- Wegrzyn G y Czyz A. 2003. Detection of mutagenic pollution of natural environment using microbiological assays. *J. Appl. Microbiol.* **95**:1175–1181.
- Wimpee CF, Nadeau TL y Nealson KH. 1991. Development of Species-Specific Hybridization Probes for Marine Luminous Bacteria by Using In Vitro DNA Amplification. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**:1319-1324.
- Wood KV. 1998. The Chemistry of Bioluminescent Reporter Assays. *Promega Notes*. **65**: 14-20.
- Xi L, Cho KW y Tu SC. 1991. Cloning and Nucleotide Sequences of lux Genes and Characterization of Luciferase of *Xenorhabdus luminescens* from a Human Wound. *J. Bacteriol.* **173**: 1399-1405.